

不透明胶布密封;

9. 在 40℃ 的热水中清洗 40 分钟, 再换一次清水, 洗 1—2 分钟, 洗净明胶保护液;

10. 在约 40℃ 温箱内干片。

11. 用明胶-甘油混合液封片(混合液配方: 蒸馏水 30 毫升, 明胶 5 克, 甘油 35 毫升, 酚 1—5 克)。

电子显微镜标记技术

1. 将专一的抗体血清, 用加 0.2% 牛血清蛋白(BSA) 和 0.05% Tween 100 的 PBS 缓冲液稀释 4—8 倍, 然后浸泡粘在铜网上的 L. R. White 超薄切片 30—60 分钟;

2. 用以上缓冲液清洗 2 次, 每次 10 分。清洗时最好将铜网放在一个玻璃培养皿内, 用磁搅拌器缓慢搅拌;

3. 将稀释 10—20 倍的蛋白 A-金胶体溶液浸泡 30—60 分钟(用 PBS + 1% BSA + 0.05% Tween 100 溶液来稀释);

4. 用以上缓冲液清洗 2 次, 每次 10 分钟, 方法

和 2 相同;

5. 再用蒸馏水清洗 5 分钟, 换 2 次;

6. 用 2% 醋酸铀(溶在 50% 酒精内成饱和液)染 5—7 分钟;

7. 电镜观察。

这一技术有以下优点: 1. 能同时做光学显微镜薄切片和电子显微镜超薄切片; 2. 经 L.R. White 包埋的材料内的抗原活性基本不变; 3. 并不妨碍抗体渗透入塑料。加上这一技术操作方便、可靠, 易于重复, 故此值得大家试用。

参 考 文 献

- [1] Craig, S., and Goodchild, D. J. 1982, *Eur. J. Cell Biol.* 28: 251-256.
- [2] Craig, S. and Goodchild, D. J. 1984, *Protoplasma* 122: 35-44.
- [3] Danscher, G. and Rytter Norgaard, J. O. 1983, 31: 1394-1398.

核 膜*

陈 涛

(北京市海淀区教师进修学校)

核膜的超微结构

在电子显微镜下, 可见核膜是由内、外两层单位膜及其所夹的低电子密度透明腔隙所组成。这个腔隙称为核周腔, 其宽度随细胞的不同区域、类型和生理状况而异, 变化幅度为 150—700 Å。核周腔与细胞质中的粗面内质网囊腔相通连。

核膜的内膜和外膜的厚度均为 75 Å 左右。但是, 内膜和外膜在功能上和生化成分上是有所不同的。外膜外表面经常附着核糖体, 有时与粗面内质网相连。内膜既无核糖体附着, 又不与内质网相接, 在它的内表面上, 常饰有由异染色质团块和蛋白质细丝共同组成的具有中等电子密度的纤维网状结构, 称为纤维层。在垂直横切面的电镜照片上, 纤维层呈蜂窝状。无脊椎和脊椎动物相比, 前者蛋白细丝较粗, 纤维层较厚。例如, 医蛭(*Hirudo medicinalis*)的蛋白细丝直径为 30—50 Å, 纤维层厚度为 900—2000 Å, 而哺乳类动物的纤维层平均厚度一般在 300 Å 以下, 在脊椎动物中, 纤维层的蛋白质细丝主要是由一种结构蛋白质

单位所组成的。这种蛋白质单位是由三个分子量为 60,000—70,000 道尔顿的多肽分子装配在一起而形成的。这三个多肽分子一方面同核膜内膜内表面上嵌于磷脂分子层中的特异蛋白相结合, 另一方面又与染色质上的特异部位相结合, 从而使染色质同核膜连接在一起。

内、外两层核膜在一定间隔处, 彼此融合形成核孔。其大小、数目、密度和分布因细胞的种类、生理状态和外界温度的不同而异。孔径的变化范围是 300—1000 Å, 一般在 600 Å 左右。代谢旺盛的细胞, 核孔数目多, 密度也大。例如, 20—25 岁男性的睾丸间质细胞的核孔数目大大超过 70 岁以上的男性。未成熟的蛙卵母细胞较成熟的代谢活跃, 核孔密度也多 40%。核孔的分布也不总是随机的。有时呈正方形和六角形排列, 有时大量密集在某一区域, 使得某些区

* 在完成本文的过程中得到了翟中和教授的指导, 在此致谢。

域几乎看不到核孔,在精母细胞和精子头部的核膜上,常可见到这种密集现象。

在透射电镜下观察,核孔周缘呈圆形或八角形。沿着内、外两面都有些凹陷的核孔周缘,各自都被八个直径各约100—200Å的球状颗粒所环绕。这十六个球状颗粒由细丝卷曲盘绕而成,统称环孔颗粒。在核孔中心,时常可见一个近似球形的物体,它占有核孔有限空间的一部分,并与其周围的颗粒以细丝彼此相连。一些细胞的核孔还覆盖着一薄层隔膜,其厚度仅达单位膜中的一个致密层的厚度。但是,也有人认为这是由于在切片时,刀口切面倾斜而造成的一种假象。上述这一整套复杂的核孔结构总称核孔复合体。

核膜的功能

1. 保护性的屏障:

首先,构成膜骨架的磷脂分子是一种非离子型表面活性物质,能够显著地降低细胞核内及核周腔内液体的表面张力和表面能,使细胞核处于能量较低的稳定状态。其次,核膜是选择性渗透膜,它的双膜结构能够有效地阻挡极性分子通透,屏蔽核内、外的电磁场效应,使细胞核内环境的温度、压力、pH值、化学成分和电磁效应维持相对恒定,成为细胞质中的一个相对独立和稳定的系统。再次,由于细胞核内、外同时进行着种种生理生化活动,有发生彼此相互干扰的可能性。核周腔在降低这些干扰作用,特别是一些核外不良影响方面起着一定的作用。笔者认为,低能量的核周腔不仅仅是一条位于核质与胞质之间的物质交换通道,而且是一条介于细胞核与细胞质之间的生理缓冲地带。就加强核膜的屏障功能而言,核周腔是一个不可忽视的结构单位。

2. 酶分子的支架:

核膜上富集着大量的酶系,应用生物化学技术目前已经从脊椎动物细胞的核膜里提取和分离出54种酶蛋白分子。其中很多酶和细胞的糖代谢、脂代谢和蛋白质代谢有关。有些酶同能量代谢和核膜主动运输有关。利用细胞化学技术证实,细胞色素C氧化酶分布在内膜上,人们认为,这些区域很可能就是核内氧化磷酸化偶联反应的场所。从而进一步推论,核内代谢活动所需要的能量至少部分是内源性的。更为引人注目的是,在核膜上还发现了同核酸的复制、合成及修饰过程有关的DNA转环酶——一种重要的拓扑异构酶、DNA聚合酶 ν 、RNA酶和核苷三磷酸酶。

由于这些酶多以膜蛋白形式镶嵌在核膜的磷脂分子层中,彼此保持一定的间距和组合。这一特点大大地

利于各种生物化学反应的有序进行以及彼此间的正、负反馈调节。核膜还为位于其上的酶蛋白分子提供了比较恒定的外环境,使膜上的酶蛋白得以维持一定的空间构象,从而发挥出高度的催化活性。

3. 基因调控的阀门

核膜在基因表达过程中的调控作用表现在不同的水平上。核膜本身就含有核酸成分,在使用多种不同制备技术而获得的大鼠肝细胞核膜样品中,都可检测出核酸成分的存在。其中DNA的含量为0—8%,RNA的含量为1—10%。人们还在上述实验中发现,在大鼠肝细胞核膜中存在的一些RNA以不与核糖体结合的形式存在。Yoshida等人还在核膜成分中,发现有DNA聚合酶 ν 和DNA转环酶。这两种酶在DNA复制的起始阶段具有非常重要的作用,后者是被称为复制因子的一种拓扑异构酶。有人认为,DNA的早期复制发生于离开内膜的部位,而晚期复制却发生在异染色质的内膜附着点附近。由此看来,核膜在DNA合成过程中,很可能起一定的作用。核膜含有多种RNA酶,可能参与RNA前体的修饰反应。由于三种成熟的RNA分子进入胞质的主要通道是核孔,所以核孔的启闭和孔径的变化能直接有效地调节转录信息的流量。此外,核膜对基因表达的调控,也可以表现在翻译水平上。

4. 核、质间物质和信息的通道

核内、外的物质和信息相互交换方式主要有:(1)主动运输和被动运输:虽然至今未在核膜上发现 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵运输系统,但是核内 K^+ 浓度显著高于核外, Na^+ 浓度低于核外的现象是存在的,同时核膜上还存在有 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶,多数人认为,核膜除被动运输外,也有主动运输的功能。(2)内膜局部先向外凸起形成膜包裹泡,随后囊泡移向外膜,最后由外膜把囊泡内含物排出核外。在一般情况下,内含物多为大分子物质。(3)细胞核内物质透过内膜进入核周腔,然后经外膜外翻到核外或由通向粗面内质网囊腔的管道进入细胞质中。(4)通过核孔运输。同位素示踪实验证明,mRNA、tRNA、rRNA和核糖核蛋白大多是通过核孔来到核外的。在细胞质中合成的DNA复制酶、转录酶和胰蛋白酶等蛋白质大分子大多也是通过核孔进入核内的。因此有人建议,把核膜上单位面积的核孔数做为判别核膜有效运输能力的一项指标。(5)在核膜的局部,内、外核膜及它们之间的核周腔同步化地向细胞质中凸起,部分膜结构融解后,内含物排出细胞核外。

5. 促进蛋白质的合成

核膜的外膜具有激素分子的受体, 外膜的膜表面提供了核糖体和多聚核糖体附着场所, 对细胞质中的蛋白质合成起到间接的促进作用。

核膜的动态变化

很长时间以来, 核膜被单纯地视为一道屏蔽核质的静态结构。现在人们认识到, 核膜还是一个处于不断运动状态的特殊细胞器。在细胞周期的不同时期, 核膜有相应不同的运动方式。

在S期, 当核内大量合成DNA或RNA时可见核膜的表面积也有明显扩增现象。在间期, 一般而言, 核膜的主要运动方式有两种, 膜的内吞、外排、扩展和收缩运动, 膜内分子的微观运动。

在分裂期, 核膜的运动表现出周期性地崩解、消失到重建过程。由于磷脂分子具有表面活性剂的特性, 核膜的重建可能并不消耗过多能量。关于核膜崩解的起因, 吸引了许多科学工作者的兴趣, 有人从发育中的爪蟾卵母细胞质中提取出一种成熟起动因子, 把它注射到其它两栖类卵母细胞内之后, 能够引起核膜的崩解。同时人们还发现, 在刚刚受精的卵细胞中, 这种因子的活性高峰恰恰出现在G₂期将要结束, 分裂将要起始之时。因此, 有人推论, 脊椎动物核膜的崩解和重建是由一些细胞质因子所控制的。

核膜与其它细胞器的关系

在细胞分裂间期, 染色质主要是异染色质, 异染色质经常有规律地分布在内膜附近和附着在内膜的内表面上。染色质对内膜的附着与游离主要受控于纤维层三个多肽分子的存在状态, 而这三个多肽分子是否处于自动聚合状态又是由其本身是否被磷酸化所决定的。染色体也有附着现象, Franke等在进行了一系列实验后提出, 一些镶嵌在核膜上的DNA分子被膜脂蛋白所保护, 能够抵抗DNA酶的水解, 具有可靠的稳定性。当染色体的特定位点上的DNA分子同这些核膜DNA分子相连接时, 染色体就附着在内膜内表面上了, 这些核膜DNA在染色体附着核膜时, 起着“挂钩”作用。普遍认为, 染色体附着在核膜上对有丝分裂和减数分裂前期的染色体定向具有重要的作用。

在细胞分裂间期, 外膜多与内质网相连续, 核周腔多与内质网囊腔相通连。外膜和内质网都含有很多相同的酶。例如, 应用免疫化学技术证实这两者都含有NADPH-细胞色素C氧化酶、细胞色素P-450和NADH-细胞色素b₅还原酶等等。一般认为, 光滑型内质网参与细胞分裂末期的核膜重建, 外膜有时也

能够以芽生的方式形成内质网。

在细胞核分裂开始前, 许多线粒体靠近核膜的外膜。此时, 即使它们之间没有以其膜性结构直接相连, 也是接触十分紧密的。有人认为, 这与能量交换有关, 对核膜的崩解起一定的促进作用。也有人认为这是样品制备过程中人为造成的一种假象。

核膜的外膜常附有核糖体和多聚核糖体。在胚胎期蛋白质合成旺盛的细胞里尤其明显。利用免疫电镜技术发现, 最早形成的抗原-抗体复合物多分布在外膜上。这意味着附着在核膜上的核糖体很可能最先受到来自核内的遗传信息并且在其上翻译表达的。

一般来说, 在正常生理条件下, 绝大多数位于间期的动、植物细胞都有一对靠近核膜的中心粒。但是, 有人在核膜内部所形成的一些囊泡状结构中也发现有中心粒的存在。关于这两者的关系问题, 研究工作尚在进行。

在蕨类植物(*Pteridium* sp.)成熟的精子中, 有时可见微管微丝环绕着细胞核, 并且与核膜形成复合物结构。

综上所述, 核膜既具有一般生物膜的共同属性, 又兼具有其自身的特殊性。它的功能不仅限于调控细胞核与细胞质之间的物质交流和信息交流, 而且广泛地涉及到细胞内许多重要的生理生化过程。正是如此, 关于核膜结构与功能的研究已逐渐成为当前细胞生物学领域中的一个重要课题。

参 考 文 献

- [1] Harrison R. and Lunt, G. G., 1981, *Biological Membranes Their Structure and Function*, 中译本, 科学出版社, 15—17.
- [2] 第二军医大学电镜室. 复旦大学生物系电镜室, 细胞超微结构与功能, 上海科学技术出版社, 1981, 11—16.
- [3] 杨福愉, 1981, 生物化学与生物物理进展, 41, 1—6.
- [4] 傅献彩、陈瑞华, 1979, 物理化学, 下册, 人民教育出版社, 433—460.
- [5] Fabergé, A. C., 1974, *Cell Tissue Res.* 151 403.
- [6] Dwyer, N and Blobl, G., 1976, *J. Cell Biol.* 70: 581—591.
- [7] Ghadially, F. N., 1975, *Ultrastructural Pathology of the Cell*, Butter-worths London and Boston, 24—28.
- [8] Dyson, R. D., 1978, *Cell Biolog*, Allyn and Bacon Inc, 452—458.

- [9] Kirschner, R. H. et al., 1977, *J. Cell Biol.* 77: 118.
- [10] Schatten, Gand Thoman, M., 1978, *J. Cell Biol.* 77: 517.
- [11] Plichinger, C. J., et al, 1979. *Medical Cell Biology*, Philadelphia, W. B. Saunders Co.,
- [12] De Robertis, E. D. P., et al., 1980, *Cell and Molecular Biology*, Philadelphia, W. B. Saunders Co., 334—337.
- [13] Han, S. S. and Holmstedt, J. O. V., 1979, *Cell Biology*, New York, McGraw-Hill.
- [14] Karp, G., 1979, *Cell Biology*, New York, McGraw-Hill.
- [15] Hopkins, C. R., 1978. *Structure and function of Cells*, W. B. Saunders Co., London Philadelphia and Toronto, 133—135.
- [16] Sheeler, P. and Bianchi, D. E., 1980, *Cell Biology: structure, biochemistry and function*, New York, John Wiley and Sons.
- [17] Gerace, L. and Blobel. G., 1980, *J. Cell* 19: 277—287.
- [18] Schwartz, L. M. and Azar, M. M., 1981, *Advanced Cell Biology*, New York, Van Nostrand Reinhold Co., 1124—1137.
- [19] Dillon, L. S., 1981, *Ultrastructure Macromolecules and Evolution*, Plenum Press, New York and London, 52—62.
- [20] Purrello, F. et al., 1982, *Science*, 216: 1005—1006.
- [21] Franke, W. W. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 91: 39—50.
- [22] Bruce, A. et al., 1983, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc., 429—434.
- [23] Thorpe, N. O., 1984, *Cell Biology*, John Wiley and Sons, 462—485.
- [24] Geracel, Blobel. G, 1982, *Nuclear Lamina and The Structural Organization of the Nuclear. Evenlope*, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 46 (pt 2), 967—978.
- [25] Turrer W. A. et al., 1982 Aug, *Exp Cell Res.* 140 (2): 267—273.

晶体锇酸安瓿瓶的安全破裂法

张和民

(中国科学院植物研究所)

锇酸是电镜样品制备中主要的固定剂，它是剧毒试剂，并被密封在壁较厚的安瓿瓶中，从晶体锇酸配制固定液时，须将安瓿瓶破裂，常用安瓿瓶的破裂方法是在洁净的安瓿瓶的中部用小砂轮或钻石刀划一痕，然后将安瓿瓶放入洁净的小棕色试剂瓶中，再用一洁净的粗玻璃棒的一端对准安瓿瓶的中部一敲，使其破裂。此法要求敲击之力适度而准确，破裂不成功，可能安瓿瓶和棕色试剂瓶皆破或棕色试剂瓶破裂而安瓿瓶无损。

我们在工作中探索了一种简单、安全破裂安瓿瓶的方法，此法效果好，对熟练者或初试者来说成功率都达到百分之百。方法如下：

准备两根长10厘米左右，内径略大于安瓿瓶直径的硬塑料管或金属管(管要洁净)，硬塑料管一般如电工用于套电线用的管的质量即可，壁厚2毫米；金属管可用铜或铝内径适用的管材或用圆铜、铝材套孔，壁厚1毫米即可。使用时以安瓿瓶腰部为界，两边各

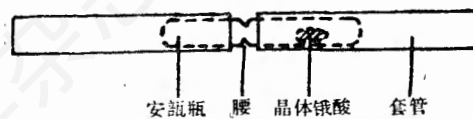


图 1

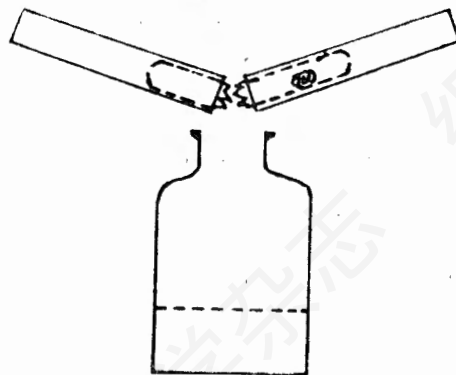


图 2

(下转第24页)